

DISS. ETH NO. 30173

**Adaptation to polyploidy associated with changes in nuclear volume
and chromatin architecture**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Amrita Möhl

M.Sc., University of Delhi

born on 08.10.1993

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Kirsten Bomblies
Prof. Dr. François Parcy
Prof. Dr. Stefanie Jonas
Prof. Dr. Sylvain Bischof

2024

Abstract

Whole genome duplication (WGD), which gives rise to polyploids, plays an important role in the evolution of eukaryotes and domestication of plants. Polyploid plants are often associated with agronomically and ecologically advantageous traits compared to their lower-ploidy progenitors, such as greater environmental stress resistance, larger fruits, seeds and leaves. However, WGD may initially pose fundamental challenges to cellular processes, including a commonly observed increase in nuclear size to accommodate the doubled amount of DNA. This increase in nuclear size changes the ratio between nuclear surface area and volume, with potential consequences for the spatial organization of DNA, transcriptional regulation, molecular transport, and coordination between nuclear and cytoplasmic processes. The abundance of polyploids in nature shows that plants can evolve to overcome such challenges associated with WGD, but the specific adaptations remain elusive. To overcome WGD-associated challenges, we might expect plants to either adapt their cellular processes to a larger nuclear size, or that nuclear size downscales during evolution. The latter has already been observed for cell size in many polyploid organisms, but nuclear size has not been examined in detail. Nuclear downsizing could result from reduced DNA content or through greater DNA compaction. To ask whether, and if so, how, nuclear size evolves after WGD, I used natural diploid and tetraploid populations of *Arabidopsis arenosa* to study the long-term trend, as well as artificially generated neo-tetraploids, to understand the immediate effects of WGD. I found that evolved tetraploids have lower nuclear size than neo-tetraploids, and that this reduction is not accompanied by a reduction in DNA content. Instead, evolved tetraploids showed higher DNA density per unit volume, indicating greater chromatin compaction. That evolved tetraploids are able to downsize nuclear size by increasing compaction was also evidenced by our high-throughput chromosome conformation capture (Hi-C) approach, where the Interaction Decay Exponent (IDE) was lowest (more negative) in evolved tetraploids. In contrast, our data suggests that the increase in nuclear size upon WGD in neo-tetraploids is primarily due to a higher amount of DNA relative to diploids as I did not observe any change in chromosomal compaction.

In search for the molecular mechanisms involved in driving the changes in nuclear and chromatin architecture during adaptation to polyploidy, I focused on chromatin remodelers that were found to be under selection in genome scans of natural populations of *A. arenosa*. Among these, one group of chromatin remodelers, the MORCs, was of particular interest as they are known to be involved in chromosomal compaction in many species. Taking advantage of *morc* triple mutants in *A. thaliana*, I have shown that loss of MORCs (and the resulting change in chromatin compaction) affects nuclear size, with *MORC6* being the major contributor. Given the significant role of *MORC6* in regulating nuclear volume in *A. thaliana*, I focused on investigating the diploid vs tetraploid alleles of *MORC6*. As MORC proteins often work in complexes, I tested whether the different alleles of *MORC6* influence its interactions with *MORC1*. Like *MORC6*, *MORC1* was also found to be under selection in tetraploid *A. arenosa* and might

thus also be causal for the increased compaction and reduced nuclear size observed in evolved tetraploids. I studied this interaction in two independent protein interaction studies, Yeast two hybrid and FLIM-FRET, which revealed that the tetraploid alleles of *MORC6* and *MORC1* have the strongest interaction intensity. Whether the strength of these interactions has any functional consequence for chromosomal compaction remains to be tested. However, tetraploid allele of *MORC6* alone had no significant effect on nuclear volume relative to the diploid allele in segregating lines—whether there would be an effect if we also included *MORC1* variants in the segregating lines remains to be tested. We conclude that nuclear size increases after WGD and decreases again during subsequent evolution of the established tetraploids (which are estimated to be about 30,000 generations old). This reduction in nuclear size is associated with greater chromosomal compaction, possibly carried out by chromatin remodelers such as the MORCs, although more work is required to assess their involvement. Our work contributes to the understanding of polyploid evolution and in particular sheds light on how nuclear volume and chromatin architecture evolves in response to the challenges associated with WGD.

Zusammenfassung

Die Duplikation des gesamten Genoms ('whole genome duplication', WGD) führt zu polyploiden Organismen und spielt eine wichtige Rolle in der Evolution von Eukaryoten und der Domestizierung von Pflanzen. Polyploide Pflanzen weisen oft agronomisch und ökologisch vorteilhafte Merkmale auf im Vergleich zu ihren Vorläufern mit niedrigerem Ploidiegrad, wie z.B. höhere Umweltstressresistenz oder grössere Früchte, Samen und Blätter. Allerdings kann WGD zunächst fundamentale Herausforderungen an zelluläre Prozesse stellen, einschliesslich der häufig beobachteten Vergrösserung des Nukleus um die verdoppelte DNA-Menge aufzunehmen. Dies verändert das Verhältnis zwischen Nukleusoberfläche und -volumen, mit möglichen Konsequenzen für die räumliche Organisation der DNA, die transkriptionelle Regulation, den molekularen Transport sowie die Koordination zwischen nuklearen und zytoplasmatischen Prozessen. Die Häufigkeit von polyploiden Pflanzen in der Natur zeigt, dass sie in der Lage sind, diese mit WGD verbundenen Herausforderungen zu überwinden, aber welche spezifischen Anpassungen damit einhergehen, ist wenig erforscht. Man könnte erwarten, dass Pflanzen entweder ihre zellulären Prozesse an einen grösseren Nukleus anpassen, oder dass die Grösse des Nukleus im Laufe der Evolution wieder abnimmt. Letzteres wurde bereits für die Zellgrösse vieler polyploider Organismen beobachtet, aber für Nuklei noch nicht im Detail untersucht. Eine Verkleinerung des Nukleus könnte entweder durch eine reduzierte DNA-Menge oder durch eine Verdichtung der DNA erfolgen. Um zu untersuchen, wie sich die Grösse des Nukleus nach WGD evolutionär entwickelt, habe ich natürliche diploide und tetraploide Populationen von *Arabidopsis arenosa* verglichen. Ausserdem erzeugte ich künstlich Neotetraploide, um auch die unmittelbaren Auswirkungen von WGD zu verstehen. Ich fand heraus, dass evolvierte Tetraploide kleinere Nuklei als Neotetraploide aufweisen und dass diese Reduktion nicht mit einer Verringerung des DNA-Gehalts einhergeht. Stattdessen zeigten evolvierte Tetraploide eine höhere DNA-Dichte pro Volumeneinheit, was auf eine stärkere Verdichtung des Chromatins hindeutet. Eine Verdichtung des Chromatins konnten wir mittels 'high throughput chromosome conformation capture' bestätigen, da der Interaktionszerfalls-Exponent (IDE) bei evolvierten Tetraploiden am negativsten war. Im Gegensatz dazu legen unsere Daten nahe, dass die Vergrösserung des Nukleus nach WGD bei Neotetraploiden hauptsächlich auf eine höhere DNA-Menge im Vergleich zu Diploiden zurückzuführen ist, da ich keine Änderung der Chromatindichte beobachtet habe.

Auf der Suche nach den molekularen Mechanismen, welche die Veränderungen in der Nukleus- und Chromatinarchitektur während der Anpassung an die Polyploidie bewirken, konzentrierte ich mich auf 'Chromatin-Remodellierer', die laut Genom-Scans von natürlichen Populationen von *A. arenosa* unter Selektion stehen. Eine Gruppe dieser Chromatin-Remodellierer, die sogenannten *MORCs*, war für mich von besonderem Interesse, da sie bekanntermassen die Chromatindichte in vielen Arten (mit)reguliert. Mit dem Einsatz von *morc*-Triplemutanten in *A. thaliana* konnten wir zeigen, dass ein Verlust der *MORCs* (und die

damit veränderte Chromatindichte) die Nukleusgrösse beeinflusst, wobei *MORC6* den grössten Anteil an diesem Effekt hatte. Angesichts der bedeutenderen Rolle von *MORC6* bei der Regulierung des Nukleusvolumens in *A. thaliana*, konzentrierte ich mich darauf, die diploiden und tetraploiden Allele von *MORC6* zu untersuchen. Da MORC Proteine oft in Komplexen arbeiten, testete ich, ob die verschiedenen Allele von *MORC6* die Wechselwirkungen mit *MORC1* beeinflussen. Wie bei *MORC6* wurde auch bei *MORC1* festgestellt, dass es in Tetraploiden von *A. arenosa* unter Selektion steht und daher auch für die erhöhte Dichte und die reduzierte Nukleusgrösse verantwortlich sein könnte, die bei evolvierten Tetraploiden beobachtet wurden. Ich untersuchte diese Interaktion mittels zwei verschiedenen Methoden um Proteininteraktionen zu quantifizieren: die sogenannte ‘Yeast two hybrid’-Methode sowie FLIM-FRET. Diese zeigten, dass die tetraploiden Allele von *MORC6* und *MORC1* die stärkste Interaktionsintensität aufweisen. Ob dies funktionelle Konsequenzen für die Dichte der Chromosomen hat, bleibt zu testen. In meiner Studie hatte das tetraploide Allel von *MORC6* keinen signifikanten Effekt auf das Nukleusvolumen im Vergleich zum diploiden Allel in segregierenden Linien—ob es einen Effekt geben würde, wenn wir auch *MORC1*-Varianten in den segregierenden Linien einschliessten, bleibt offen. Wir kommen zum Schluss, dass die Nukleusgrösse nach WGD zunimmt und sich im Verlaufe der Evolution (geschätzt etwa 30'000 Generationen bei unseren Tetraploiden) wieder verringert. Diese Verkleinerung des Nukleus ist mit einer Verdichtung der Chromatins verbunden, was möglicherweise in Zusammenhang mit Chromatin-Remodellierern wie den MORCs steht, auch wenn weitere Arbeiten erforderlich sein werden, um dies abschliessend bewerten zu können. Unsere Arbeit trägt daher zum generellen Verständnis der Evolution von Polyploiden bei und beleuchtet insbesondere, wie die Nukleus- und Chromatinarchitektur auf die mit WGD verbundenen Herausforderungen reagiert.